

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ**

**ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΙΧΘΥΟΛΟΓΙΑΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ**

**ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ**

**Μοριακά αποτυπώματα προκαρυωτικών μικροοργανισμών στη  
λίμνη της Καστοριάς με τοξικές ανθίσεις κυανοβακτηρίων**

**ΒΑΣΙΛΙΚΗ ΚΟΝΤΟΓΙΑΝΝΗ**

**ΒΟΛΟΣ, 2006**

Μοριακά αποτυπώματα προκαρυωτικών μικροοργανισμών στη λίμνη της Καστοριάς  
με τοξικές ανθίσεις κυανοβακτηρίων.

Μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής επιτροπής:

- 1) Κωσταντίνος Αρ. Κορμάς, Επίκουρος Καθηγητής, «Οικολογία Υδάτινης Στήλης με Έμφαση στα Μικροβιακά και Τροφικά Είδη», Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, επιβλέπων.
- 2) Αθανάσιος Εξαδάκτυλος, Λέκτορας, «Γενετική Υδρόβιων Ζωικών Οργανισμών», Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, μέλος.
- 3) Μαρία Μουστάκα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια, «Υδροβοτανική», Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, μέλος.

## ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργαστηριακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο Τμήμα Γεωπονίας Ιχθυολογίας και Υδάτινου Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας με επιβλέποντα τον Επίκ. Καθηγητή Κωνσταντίνο Αρ. Κορμά και συνεπιβλέποντες τον Λέκτορα Αθανάσιο Εξαδάκτυλο και την Αναπλ. Καθηγήτρια. Μαρία Μουστάκα.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά όλους όσους συνέβαλαν στην πραγματοποίηση της διπλωματικής μου εργασίας. Πρώτα από όλα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Κορμά για τις γνώσεις που μου παρείχε και την διαρκή συμβολή του στον εργαστηριακό χώρο. Τον κ. Εξαδάκτυλο για τις ιδέες που μου προσέφερε στην αντιμετώπιση διαφόρων προβλημάτων κατά τη διάρκεια της εργαστηριακής μελέτης καθώς και την κ. Μουστάκα που έχει πραγματοποιήσει πολύ σημαντικές μελέτες στη λίμνη της Καστοριάς οι οποίες με βοήθησαν να εντρυφήσω στο αντικείμενο. Επίσης θέλω να ευχαριστήσω τον κύριο Μαργαριτόπουλο του Εργαστηρίου Εντομολογίας και Γεωργικής Ζωολογίας του Τμήματος Φυτικής Παραγωγής της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας για την παραχώρηση του αναδευτήρα που χρειάστηκε κατά την εκπόνηση της εργασίας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω επίσης τη φίλη μου Ματίνα Κατσιάπη που εκπονεί επίσης τη μεταπτυχιακή της εργασία στη λίμνη της Καστοριάς και με βοήθησε σημαντικά κατά τη διάρκεια της δειγματοληψίας, τη συνάδελφό μου Νίκη Ματζαφλέρη για τα δεδομένα που μου προσκόμισε (θερμοκρασίες,  $O_2$ ,  $NO_3^-$ -N,  $NH_3$ -N, Φώσφορο) από το Δήμο Καστοριάς, καθώς και τη μητέρα μου Ελένη Κοντογιάννη και τους φίλους μου Γιάννη Διατσίδα, Βασίλη Κωνσταντάκο, Θανάση Κωνσταντάκο, Κατερίνα Μίχου, Γιώργο Γκάφα, Νέστορα Καπετάνιο, Βαλέρια

Παπαγεωργίου, Γιάννη Γούγα και Χρήστο Παλαιοκώστα που με υπόμεναν και με βοήθησαν υλικά αλλά και ψυχολογικά.

Τέλος ξεχωριστές ευχαριστίες στον Λέκτορα κ. Σαπουντζή Μάριο που με παρότρυνε να ασχοληθώ με τον τομέα της μικροβιολογίας και με στήριξε ανεκτίμητα κατά τη διάρκεια πραγματοποίησης της εργασίας, μεταφέροντας μου εμπειρίες από τον επιστημονικό τομέα αλλά και αξίες που θα με συνοδεύουν για πάντα.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή μελετήθηκε η μοριακή ποικιλότητα βακτηρίων στο ίζημα της λίμνης της Καστοριάς, που είναι γνωστή τοξικούς κυανοβακτηριακούς ανθούς. Η δειγματοληψία ιζήματος έγινε από τρεις σταθμούς. Απομονώθηκε DNA από το ίζημα και ακολούθησε ενίσχυση με ειδικούς εκκινητές για βακτήρια 16s rRNA γονίδια των προκαρυωτικών οργανισμών με την τεχνική της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR). Ακολούθησε κλωνοποίηση των γονιδίων και δημιουργία γονιδιακής βιβλιοθήκης. Έγινε ανάλυση των αλληλουχιών που προέκυψαν από αλληλούχιση των γονιδίων και σύγκριση τους με γνωστές αλληλουχίες της βάσης δεδομένων της GenBank μέσω του BLAST ώστε να βρεθούν συγγενείς φυλότυποι. Ελέγχθηκε η ύπαρξη χμαιοικών αλληλουχιών με το πρόγραμμα CHIMERA\_CHECK του Ribosomal Database Project, και απορρίφθηκαν. Κατασκευάστηκε φυλογενετικό δέντρο των 16rRNA γονιδίων με το λογισμικό PAUP 4.0. Οι περισσότεροι φυλότυποι που αναγνωρίστηκαν ήταν συγγενείς φυλογενετικά με αντιπροσώπους των Proteobacteria και κυρίως των β-Proteobacteria. Επίσης είχαμε και αντιπροσώπους από τα φύλα Acidobacteria, Chlorobi, Chloroflexi, Bacillales, Spirochaetas, Gemmatimonadetes, και Verrucomicrobia. Τέλος δεν αναγνωρίστηκαν αλληλουχίες που να ανήκουν στα Cyanobacteria, αν και η λίμνη της Καστοριάς είναι λίμνη με τοξικές ανθίσεις κυανοβακτηρίων, ενώ είχαμε το μεγαλύτερο πλήθος των φυλοτύπων να αποτελείται από ακαλλιέργητους μέχρι σήμερα κλώνους εξαιτίας της μεγάλης βιοποικιλότητας του ιζήματος.

Λέξεις κλειδιά: ίζημα, λίμνη, Bacteria, Καστοριά

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	Εισαγωγή.....	1
2.	Υλικά και Μέθοδοι.....	8
2.1	Δειγματοληψία.....	8
2.2	Απομόνωση DNA.....	10
2.3	Αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσης (PCR) ενίσχυσης του γονιδίου 16S rRNA.....	10
2.4	Κλωνοποίηση.....	12
2.5	Επεξεργασία αποικιών μετά την κλωνοποίηση.....	13
2.6	Αλληλούχιση.....	16
2.7	Φυλογενετική ανάλυση .....	16
3.	Αποτελέσματα.....	18
4.	Συζήτηση.....	33
5.	Βιβλιογραφία.....	39
6.	Abstract.....	49

## 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

### 1.1 Η λίμνη της Καστοριάς

Η λίμνη είναι καρστική, τεκτονικής προέλευσης και σχηματίστηκε πριν από περίπου 10.000.000 χρόνια. Βρίσκεται σε υψόμετρο 630 m και παρουσιάζει νεφροειδές σχήμα που οφείλεται στην εισχώρηση της λοφώδους χερσονήσου. Η σημερινή λίμνη αποτελεί κατάλοιπο μιας παλαιότερης εκτεταμένης που είχε έκταση 164 Km<sup>2</sup> και είχε βάθος μεγαλύτερο από 50 m. Η σημερινή της έκταση είναι περίπου 28 Km<sup>2</sup> και το μέγιστο βάθος της είναι περίπου 9 m. Οι γεωγραφικές της συντεταγμένες είναι : γεωγραφικό πλάτος 40° 31' Β και γεωγραφικό μήκος 21° 18' Α.



Εικόνα 1 : Αεροφωτογραφία της λίμνης της Καστοριάς (Χατζησπύρου Γιώργος, [www.ert.gr](http://www.ert.gr), Απρίλιος 2006).



Ο όγκος των νερών της είναι περίπου 100.000.000 κυβικά μέτρα και το ανάπτυγμα των ακτών της είναι 30,8 Km.

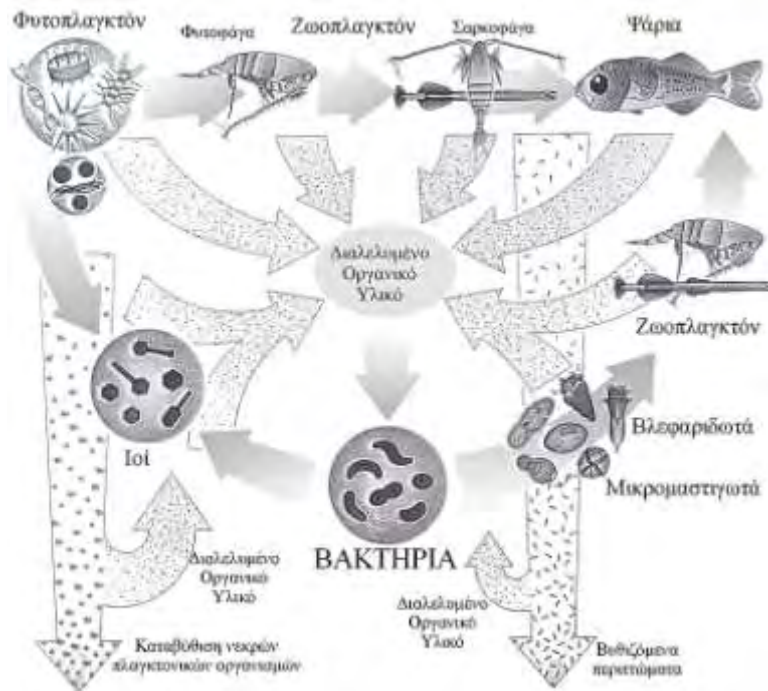
Κύρια πηγή τροφοδοσίας της λίμνης είναι το νερό της βροχής που είτε αποτίθεται απευθείας ή μεταφέρεται μέσω χειμάρρων (Σταυροπόταμου ή Ξηροπόταμου, Τοιχολίστη, Μεταμορφώσεως και Λάκκου) αλλά και από υπολίμνιες πηγές. Στο νότιο τμήμα της λίμνης μια διώρυγα (ρέμα Γκινόλι) ενώνει τη λίμνη με τον ποταμό Αλιάκμονα στον οποίο μεταφέρεται η περίσσεια νερού μέσω θυροφράγματος.

Τα νερά της λίμνης παγώνουν το χειμώνα για 2-5 εβδομάδες. Έχει αναφερθεί σταδιακή μείωση του βάθους της λίμνης που πιθανά οφείλεται σε επέκταση των καλαμιώνων και στην εισροή φερτών υλικών (χείμαρρος Σταυροποτάμου).

Στη λίμνη παρουσιάζεται το φαινόμενο του ευτροφισμού με κύρια αίτια την εισροή οργανικού υλικού από το αστικό περιβάλλον αλλά και από την εντατική γεωργία που χαρακτηρίζει την περιοχή (Σολοβού, 2004).

## 1.2 Οι μικροοργανισμοί που απαντώνται σε μια τυπική λίμνη

Σε μια τυπική λίμνη το μικροβιακό τροφικό πλέγμα (Εικόνα 2) απαρτίζεται, κυρίως, από αερόβια και αναερόβια βακτήρια, ιούς, φύκη καθώς και πρωτόζωα.



Εικόνα 2: Απεικόνιση του τροφικού πλέγματος σε μια τυπική λίμνη

([www.gsrt.gr/default.asp?V\\_ITEM\\_ID=1632](http://www.gsrt.gr/default.asp?V_ITEM_ID=1632), Απρίλιος 2006).

Η οργανική ύλη που εισέρχεται σε μια λίμνη παρέχει τον οργανικό άνθρακα που αποτελεί πηγή ενέργειας ή/και άνθρακα. Τα βακτήρια έχουν το ρόλο των αποικοδομητών και μετατρέπουν την οργανική ύλη σε διαλυμένο οργανικό υλικό και διοξείδιο του άνθρακα ( $\text{CO}_2$ ). Μαζί με το  $\text{CO}_2$  της ατμόσφαιρας, το ολικό  $\text{CO}_2$  χρησιμοποιείται από τα φύκη για την παραγωγή νέων φυκών και οξυγόνου (κατά τη

διάρκεια της ημέρας). Τα φυτοφάγα και πλαγκτοφάγα είδη καταναλώνουν με τη σειρά τους φυτά, φύκη και βακτήρια και τέλος τα σαρκοφάγα είδη θρέφονται με τα φυτοφάγα και πλαγκτοφάγα (Εικόνα. 3).



Εικόνα 3: Τροφική πυραμίδα, ροή ενέργειας και θρεπτικών σε μια λίμνη (<http://kpe-kastor.kas.sch.gr/limnology/limnology/parameters.htm>, Απρίλιος 2006).

Τα βακτήρια μπορεί να είναι ελεύθερα ή προσκολλημένα ή μεμονωμένα κύτταρα ή σχηματίζουν αποικίες ή και σε συσσωματώματα ή τέλος νηματοειδής μορφές.

Τα φύκη είναι κυρίως αερόβιοι οργανισμοί και για την ανάπτυξη τους χρειάζονται  $\text{CO}_2$  που συνήθως είναι διαθέσιμο από χημική και μηχανική διάβρωση, από τη διάλυση ασβεστολιθικών πετρωμάτων, από την αναπνοή των οργανισμών και από την

ατμόσφαιρα, καθώς και διάφορα ιόντα (K, Na, Ca κ.α) και ιχνοστοιχεία (Zn, Bo, Mg κ.α) που συνήθως είναι επαρκή. Τέλος, χρειάζονται και κάποια θρεπτικά συστατικά όπως άζωτο και φώσφορο που συνήθως αποτελούν περιοριστικό παράγοντα για την ανάπτυξή τους.

Στις λίμνες απαντώνται διάφορες ομάδες φυκών, όπως χλωροφύκη, διάτομα, δινοφύκη, απτοφύκη και χρυσοφύκη. Σε πολλές λίμνες όπως της Καστοριάς είναι άφθονα τα κυανοφύκη που σήμερα συγκαταλέγονται (σύμφωνα με το βακτηριακό κώδικα) στα κυανοβακτήρια (Cyanobacteria).

### 1.3 Γενικές πληροφορίες για τα κυανοβακτήρια

Τα κυανοβακτήρια είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί και παρουσιάζουν πλαγκτικό ή βενθικό τρόπο ζωής. Κάποια από αυτά έχουν την ικανότητα δέσμευσης του ατμοσφαιρικού αζώτου (VanBaalén, 1987).

Τα κυανοβακτήρια από τη φύση τους δεν είναι παθογόνα. Κάποια από αυτά όμως παράγουν τοξικές ουσίες που είναι επικίνδυνες για τους ανθρώπους και τα ζώα. Οι τοξίνες αυτές ως προς τη δράση τους μπορούν να διακριθούν σε τέσσερις κατηγορίες: ηπατοτοξίνες, νευροτοξίνες, δερματοτοξίνες και γαστροεντερικές τοξίνες (Sivonen, 1996).

Κάτω από ευνοϊκές για την ανάπτυξη των κυανοβακτηρίων συνθήκες όπως υψηλές θερμοκρασίες, υψηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών κυρίως αζώτου και φωσφόρου κ.α. παρουσιάζεται το φαινόμενο της άνθησης (bloom), δηλαδή υψηλή συγκέντρωση φυτοπλαγκτικών κυττάρων ή κυανοβακτηρίων στο επιφανειακό στρώμα νερού. Κατά την περίοδο άνθησης του νερού παρουσιάζεται ανομοιόμορφη οριζόντια κατανομή των

κυανοβακτηριακών ανθήσεων που με τον κυματισμό συχνά συγκεντρώνονται στην ακτή και δημιουργούν μια επιφανειακή κρούστα (Vardaka, 2001).

Τα είδη από τα οποία έχουν απομονωθεί τοξίνες ανήκουν στα γένη: *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Cylindrospermopsis*, *Hapthalophon*, *Lyngbya*, *Microcystis*, *Nodularia*, *Nostoc*, *Oscillatoria*, *Planktothrix*, *Schizothrix*, *Umezakia* (Carmichael, 1992, Sivonen and Jones, 1999), *Anabaenopsis* (Lanaras and Cook, 1994) και *Aphanocapsa* (Domingos et al, 1999).

Μέχρι σήμερα στην Ελλάδα δεν έχουν καταγραφεί περιστατικά τοξίνωσης από κυανοβακτήρια (Βαρδάκα, 2001). Ωστόσο από το 1987 άρχισαν να καταγράφονται τοξικά κυανοβακτήρια στις λίμνες Βεγορίτιδα, Βόλβη, Καστοριάς και Κορώνειας (Lanaras et al, 1989). Μελέτες του φυτοπλαγκτού στις παραπάνω λίμνες έδειξαν ότι οι ανθήσεις τοξικών κυανοβακτηρίων μπορούν να διαρκέσουν ακόμη και για περισσότερο από οχτώ μήνες (Moustaka-Gouni and Nikolaidis, 1990, Moustaka-Gouni, 1993, Tryfon and Moustaka-Gouni, 1997, Temponeras et al, 2000, Vardaka et al, 2000).

Μέχρι πρόσφατα η μελέτη των μικροοργανισμών γινόταν μέσω της ανάπτυξής τους σε καλλιέργειες. Σήμερα έχει γίνει βέβαιο ότι η τεχνική αυτή εκτός από χρονοβόρα ήταν και ανεπαρκής για την εύρεση πολλών μικροοργανισμών του περιβάλλοντος. Η σημαντικότερη ίσως αιτία είναι η απαίτηση ιδιαίτερων συνθηκών από κάποιους μικροοργανισμούς ώστε να αναπτυχθούν (Amann et al, 1995) καθώς και η μη καταλληλότητα συνθηκών ή η εύρεσή τους σε στατική φάση ανάπτυξης.

Λύση στο πρόβλημα των καλλιεργειών δόθηκε με την ανίχνευση των μικροοργανισμών μέσω της εύρεσης της αλληλουχίας του 16s rRNA γονιδίου τους και σύγκρισή τους με ήδη γνωστές αλληλουχίες. Κάποιες από τις περιοχές του μορίου αυτού δεν είναι συντηρητικές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για φυλογενετική

ανάλυση. Οι άλλες περιοχές που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι η 5s και η 23s αλλά δεν δίνουν τόσο αξιόπιστα αποτελέσματα (Olsen et al, 1986).

Ένα από τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της rRNA προσέγγισης που απασχόλησε και τη συγκεκριμένη μελέτη είναι ο σχηματισμός χημικών γονιδίων κατά την PCR. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με την ανάλυση των αλληλουχιών σε ειδικά προγράμματα του υπολογιστή. Πρόβλημα μπορεί να αποτελέσει και η μη ανίχνευση αλληλουχιών εξαιτίας της μικρής περιεκτικότητάς τους στο δείγμα.

Η παρούσα εργασία έχει ως στόχο την καταγραφή των προκαρυωτικών μικροοργανισμών που απαντώνται στο ίζημα της λίμνης Καστοριάς με τη χρήση μοριακών μεθόδων. Το ίζημα θεωρείται ως δεξαμενή κυττάρων και ως εκ τούτου αποτελεί ένα πιθανό αρχείο παλαιότερων ανθίσεων κυανοβακτηρίων. Η παρούσα μελέτη σκοπεύει στην ανίχνευση αυτών των κυττάρων εφ' όσον αυτά έχουν καταλήξει και συντηρηθεί στο ίζημα.

## 2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

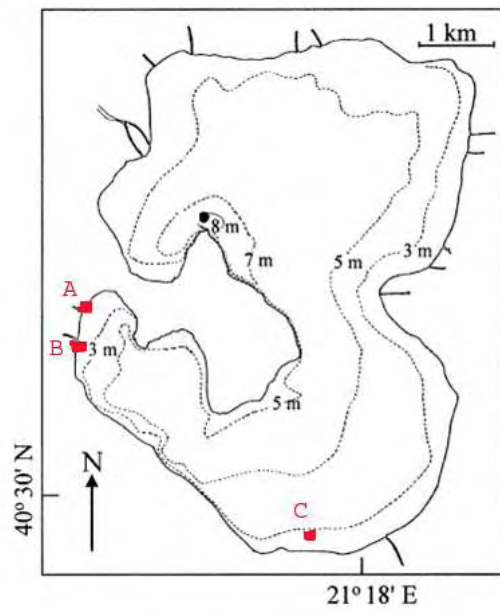
### 2.1 Δειγματοληψία

Η συλλογή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε στις 16-10-2005 σε τρεις σταθμούς στη λίμνη της Καστοριάς (Εικόνα 4). Την ημέρα της δειγματοληψίας ο καιρός ήταν αίθριος και η λίμνη δεν παρουσίαζε κυματισμό. Οι δύο σταθμοί (Α, Β) βρίσκονται στην παραλιακή ζώνη ενώ ο τρίτος (C) βρίσκεται στην πελαγική ζώνη σε βάθος 3 m. Η συλλογή του ιζήματος από τους σταθμούς Α, Β έγινε με σύριγγα σε βάθος 10 cm ενώ στον σταθμό C έγινε με τη συσκευή Ekman. Παρουσιάστηκε πρόβλημα συλλογής δείγματος από τον τρίτο σταθμό εξαιτίας του υδαρού ιζήματος.

Η θερμοκρασία περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια δειγματοληψίας ήταν 18 ° C. Η θερμοκρασία του ιζήματος ήταν 14.4 ° C και η μέτρησή της πραγματοποιήθηκε με αναλογικό θερμόμετρο.

Από δεδομένα που πάρθηκαν από το Δήμο Καστοριάς τη συγκεκριμένη ημερομηνία και για το νότιο τμήμα της λίμνης όπου έγινε η δειγματοληψία είχαμε: θερμοκρασία στα 3 m 14.2 ° C, διαλυμένο οξυγόνο στην επιφάνεια 5.2 mg/l, ενώ σε βάθος 3 m 5.23 mg/l. Τέλος  $\text{NO}_3^-$ -N 0.017 mg/l,  $\text{NH}_3$ -N 0.01mg/l και φώσφορος 0.22 mg/l (Δήμος Καστοριάς, μη δημοσιευμένα).

Τα δείγματα μεταφέρθηκαν με φορητό ψυγείο αμέσως μετά τη συλλογή στο εργαστήριο όπου έγινε μείξη των δειγμάτων και καλή ανάδευσή τους για ομογενοποίηση. Το δείγμα τοποθετήθηκε έπειτα στους -20 ° C.



Εικόνα 4: Χάρτης που αναπαριστά τη γεωγραφική κατανομή των σταθμών δειγματοληψίας (A,B,C).



Εικόνα 5 : Η περιοχή δειγματοληψίας στο σταθμό Β.



## 2.2 Απομόνωση DNA

Για την απομόνωση DNA χρησιμοποιήθηκε το Ultra Clean Soil DNA Kit (MoBio, USA) σύμφωνα με τις υποδείξεις του κατασκευαστή. Το γενετικό υλικό αποτελεί μίξη δειγμάτων επιφανειακού ιζήματος από τους (έως 5 cm βάθος) από τη λίμνη της Καστοριάς και τους σταθμούς που προαναφέρθηκαν.

Για την απομόνωση χρησιμοποιήθηκαν 0,819 gr ιζήματος και μάρτυρας, για να ελέγξουμε την καθαρότητα των αντιδραστηρίων. Μετά το τέλος της απομόνωσης, το DNA φυλάχτηκε στους -20 °C.

## 2.3 Αλυσιδωτή Αντίδραση Πολυμεράσης (Polymerase Chain Reaction, PCR) ενίσχυσης του γονιδίου 16s rRNA

Το μίγμα της αντίδρασης PCR που χρησιμοποιήθηκε είχε την παρακάτω αναλογία αντιδραστηρίων: 5 μl Buffer 10X, 5 μl dNTPs (2mM), 0.5 μl εκκινητής Bac8F 5'- 3' (100 pmolar), 0.5 μl εκκινητής Bac1492r 5'- 3' (100 pmolar), 3 μl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 34.8 ml νερό PCR, 0.2 μl Taq πολυμεράση και 1 μl δείγμα DNA. Οι συνθήκες της PCR αναφέρονται στον Πίνακα 1.

Οι PCR πραγματοποιήθηκαν με το εξής ζεύγος εκκινητών: Bac8F (5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') και Bac1492R (5'-CGGCTACCTTGTACGACTT-3').

Πίνακας I: Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τις PCR που πραγματοποιήθηκαν.

Hot start	95°C /9:00	
40 Κύκλοι	94°C /0:45	Αποδιάταξη
	52.5°C /0:45	Ισχυροποίηση
	72°C /2:00	Επιμήκυνση
Τελική επιμήκυνση	72°C /7:00	
Post PCR	10°C /60:00	

Στη συνέχεια ακολούθησε βελτιστοποίηση των κύκλων. Οι κύκλοι μειώθηκαν σταδιακά από 40 έως 10 ώστε να αποφευχθούν οι χίμαιρες και να μειωθεί τυχόν μη ειδική ενίσχυση του γονιδίου. Τελικά επελέγη για τα παρακάτω βήματα το προϊόν PCR που πήραμε από τους 12 και 14 κύκλους.

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% σε διάλυμα TAE 1X σε συνθήκες 80V, 45 min. Η χρώση πραγματοποιήθηκε μετά την ηλεκτοφόρηση σε βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr).

Ακολούθησε καθαρισμός προϊόντων PCR. Ο καθαρισμός του DNA πραγματοποιήθηκε με το kit Montage PCR (Millipore, USA), σύμφωνα με τις οδηγίες του κατασκευαστή. Χρησιμοποιήθηκαν 400 µl από το δείγμα που πήραμε από τους 12 και 14 κύκλους. Πραγματοποιήθηκε μίξη του προϊόντων PCR έτσι ώστε να έχουμε πιο συμπυκνωμένο προϊόν PCR. Ακολούθησε φυγοκέντριση στους 4 °C στα 1000g για 15 λεπτά. Ακολουθώντας αυστηρά τις οδηγίες του κατασκευαστή πήραμε καθαρό προϊόν PCR, απαλλαγμένο από πρόσθετα στοιχεία, ώστε να μπορέσει να πραγματοποιηθεί επιτυχώς η κλωνοποίηση.

## 2.4 Κλωνοποίηση

Τα πλασμίδια που χρησιμοποιήθηκαν για την κλωνοποίηση του 16S rRNA διαθέτουν τυφλά άκρα θυμίνης. Προκειμένου λοιπόν να αυξηθεί η απόδοση της κλωνοποίησης πραγματοποιήθηκε προσθήκη μονόκλωνων άκρων αδεΐνης στα άκρα των 16s γονιδίων. Η διαδικασία είναι η εξής: κατασκευή μίγματος με 0,8 μl PCR water, 0,4 μl MgCl<sub>2</sub> (25mM), 1 μl dATP (2Mm), 0,6 μl PCR buffer 10x, 0,2 μl Taq πολυμεράση και 7 μl από το καθαρισμένο προϊόν PCR προς κλωνοποίηση. Το μίγμα τοποθετήθηκε για 10 λεπτά σε υδατόλουτρο ή σε θερμοκυκλοποιητή στους 72° C.

Για την κλωνοποίηση των γονιδίων που προέκυψαν από την PCR χρησιμοποιήθηκε το kit TOPO XL (Invitrogen, USA). Για την πραγματοποίηση της κλωνοποίησης τηρήθηκαν αυστηρά οι οδηγίες του κατασκευαστή.

Χρησιμοποιήθηκαν 4 μl από το A-tailing στα οποία έγινε προσθήκη 1 μl πλασμιδίου. Ακολούθησε επώαση του μίγματος σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά. Είναι σημαντικό η διάρκεια της επώασης να μην είναι ούτε λιγότερο από 5 λεπτά γιατί κατά το διάστημα αυτό πραγματοποιείται η ενσωμάτωση του γονιδίου στα πλασμίδια, ούτε όμως να υπερβεί τα 5 λεπτά γιατί μειώνεται η απόδοση της ενσωμάτωσης.

Πραγματοποιήθηκε προσθήκη 3 μl stop solution και το αφήνουμε για 1 λεπτό σε θερμοκρασία δωματίου. Ακολούθησε ο μετασχηματισμός των βακτηρίων, όπου χρησιμοποιήθηκαν χημικώς δεκτικά κύτταρα του είδους *Escherichia coli*. Για την πραγματοποίηση του μετασχηματισμού τοποθετούμε όλο το παραπάνω μίγμα (8 μl) σε σωληνάκι κυττάρων *Escherichia coli* και το τοποθετούμε στον πάγο για μισή ώρα. Σε αυτό το στάδιο τα πλασμίδια μπαίνουν στα κύτταρα *Escherichia coli*. Μετά ακολουθεί θερμικό σοκ για 30 δευτερόλεπτα στους 42 °C και στη συνέχεια μεταφορά πάλι στον

πάγο για ακόμη 2 λεπτά. Προσθέτουμε 250 μl S.O.C medium (θρεπτικό χωρίς άγαρ) και τοποθετούμε το erppendorf οριζόντια στους 37 °C για μία ώρα.

Η επίστρωση έγινε σε τρυβλία με θρεπτικό μέσο Luria-Bertani (40gr/lit) και καναμυκίνη (50 μgr/ml) ώστε να αναπτυχθούν μόνο τα μετασχηματισμένα κύτταρα. Αυτό συμβαίνει εξαιτίας του γεγονότος ότι τα πλασμίδια περιέχουν ειδικό γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην καναμυκίνη. Επίσης στα τρυβλία θα αναπτυχθούν μόνο τα κύτταρα που έχουν ανασυνδιασμένα πλασμίδια και αυτό γιατί στην περιοχή του πολυσύνδεσμου βρίσκεται το θνησιγόνο γονίδιο *ccdB* (Bernard et al, 1994) το οποίο δεν λειτουργεί όταν ενσωματώνεται το γονίδιο εξαιτίας αλλαγής στο πλαίσιο ανάγνωσης. Η μόνη περίπτωση να αντέξει πλασμίδιο στην καναμυκίνη στο οποίο δεν έχει γίνει εισαγωγή, είναι να έχει υποστεί μεταλλαξιγένεση που θα το κάνει ανθεκτικό στην καναμυκίνη. Η πιθανότητα να συμβεί αυτό με τη χρήση του συγκεκριμένου Kit είναι 3 στις 10. Τέλος τοποθετούνται στους 37 °C για 18 ώρες ώστε να αναπτυχθούν οι αποικίες.

## 2.5 Επεξεργασία αποικιών μετά την κλωνοποίηση

Από τα τρυβλία ανάπτυξης των μετασχηματισμένων κυττάρων *E. coli* πραγματοποιούμε μεταφορά των κλώνων σε άλλα ειδικά αριθμημένα τρυβλία όπου τους αφήνουμε να ξανά αναπτυχθούν και πάλι στους 37 °C για 18 ώρες.

Από τα αριθμημένα τρυβλία παίρνουμε δείγματα από τους κλώνους και τα τοποθετούμε σε σωλήνες PCR που περιέχουν το παρακάτω μίγμα : 5 μl Buffer 10X, 5 μl DNTPs (2mM), 0.5 μl εκκινητής 5'- 3' (100 pmolar), 0.5 μl εκκινητής 3'- 5'(100

pmolar), 3  $\mu$ l  $MgCl_2$  (25mM), 34.8 ml νερό PCR, 0.2  $\mu$ l Taq πολυμεράση και 1  $\mu$ l κλώνου.

Οι PCR πραγματοποιήθηκαν με το ζεύγος εκκινήτων M13f (5'-GTAAAACGACGCCAG-3') – M13r (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') οι οποίοι είναι ειδικοί μόνο για το συγκεκριμένο πλασμίδιο. Οι συνθήκες της PCR φαίνονται στον Πίνακα. 2.

Πίνακας 2. Το πρόγραμμα που χρησιμοποιήθηκε για τις PCR των κλώνων.

Hot start	94°C /10:00	
40 Κύκλοι	94°C /1:00	Αποδιάταξη
	50°C /1:00	Ισχυροποίηση
	72°C /2:00	Επιμήκυνση
Τελική επιμήκυνση	72°C /10:00	
Post PCR	4°C /∞	

Η ηλεκτροφόρηση έγινε σε πήκτωμα αγαρόζης 1,2% σε διάλυμα TAE 1X σε συνθήκες 80V, 45 min. Η χρώση πραγματοποιήθηκε μετά την ηλεκτοφόρηση σε EtBr.

Στη συνέχεια ακολούθησαν υγρές καλλιέργειες. Έγινε παρασκευή του θρεπτικού μέσου Luria-Bertani, με συγκέντρωση 25 g/l. Ακολούθησε αποστείρωση του θρεπτικού υλικού σε αυτόκαυστο και στη συνέχεια μετά από παραμονή του σε θερμοκρασία περιβάλλοντος προστέθηκε καναμυκίνη σε τελική συγκέντρωση 50  $\mu$ g/ml. Έπειτα διαμοιράστηκε ανά 8-10 ml σε αποστειρωμένα γυάλινα σωληνάκια των 20 ml. Έγινε εμβολιασμός με τις αποικίες και τα σωληνάκια επώαστηκαν στους 37 °C για 20 περίπου ώρες σε αναδευτήρα (περίπου 200 rpm).

Για την απομόνωση του πλασμιδίου χρησιμοποιήθηκε το Plasmid DNA Purification, Nucleospin Plasmid QuickPure Kit (MACHEREY-NAGEL, Germany).

Ακολουθήθηκαν πιστά οι οδηγίες του κατασκευαστή. Από την παραπάνω διαδικασία προέκυψαν καθαρά πλασμίδια που φυλάχτηκαν στους  $-20^{\circ}\text{C}$ .

Για να γίνει επιλογή των πλασμιδίων στα οποία πραγματοποιήθηκε αλληλούχιση ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: μετά την απομόνωση πλασμιδίου πραγματοποιήθηκε PCR με δείγμα από το πλασμίδιο ώστε να διαπιστωθεί ότι η κλωνοποίηση και ο καθαρισμός ήταν επιτυχείς. Για την PCR χρησιμοποιήθηκε το παρακάτω μίγμα: 5  $\mu\text{l}$  Buffer 10X, 5  $\mu\text{l}$  DNTPs (2mM), 0.5  $\mu\text{l}$  εκκινητής 5' - 3' (100 pmolar), 0.5  $\mu\text{l}$  εκκινητής 3' - 5' (100 pmolar), 3  $\mu\text{l}$   $\text{MgCl}_2$  (25mM), 34.8 ml νερό PCR, 0.2  $\mu\text{l}$  Taq πολυμεράση και δείγμα πλασμιδίου. Οι PCR πραγματοποιήθηκαν με τον τρόπο που περιγράφηκε στον πίνακα II με το ίδιο ζεύγος εκκινητών (8F-1492R). Έπειτα ακολούθησε ηλεκτροφόρηση κάτω από τις συνθήκες που έχουν προαναφερθεί.

Τέλος ακολούθησε πέψη με περιοριστικά ένζυμα. Με τη διαδικασία αυτή το DNA του οργανισμού κόβεται σε πολλά κομμάτια με τη δράση των περιοριστικών ενδονουκλεασών. Τα ένζυμα αυτά υπάρχουν στα βακτήρια και ο φυσικός τους ρόλος είναι η προστασία των βακτηρίων από την είσοδο ξένου DNA σε αυτά. Αναλυτικότερα οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες αναγνωρίζουν μία συγκεκριμένη αλληλουχία (συγκεκριμένη για κάθε ένζυμο) 4-8 βάσεων στο DNA και το κόβουν δημιουργώντας είτε κολλώδη είτε τυφλά άκρα.

Για να γίνει επιτυχής επιλογή πλασμιδίων ώστε να αποφευχθεί η αλληλούχιση σε ίδια πλασμίδια έγινε πέψη των 16s που προέκυψαν από τις PCR στους κλώνους με το περιοριστικό ένζυμο *AluI*. Σε 10  $\mu\text{l}$  PCR προϊόντος και του κατάλληλου ρυθμιστικού διαλύματος σε αναλογία 1:2 προστέθηκε κατάλληλος όγκος ενζύμου, ώστε η τελική ποσότητα του ενζύμου να είναι 3u. Ακολούθησε επώαση για 18h στους  $37^{\circ}\text{C}$  και έπειτα το ένζυμο απενεργοποιήθηκε με επώαση για 20 λεπτά στους  $65^{\circ}\text{C}$ . Τέλος πραγματοποιήθηκε ηλεκτροφόρηση σε πήκτωμα αγαρόζης 1,6 % σε 1X TAE σε συνθήκες 80V, 60min και για τη χρώση χρησιμοποιήθηκε EtBr.

Στη συνέχεια ακολούθησε πέψη με περιοριστικό ένζυμο το *Hinf*. Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν ίδια με αυτή που πραγματοποιήθηκε με το *AluI*.

Πραγματοποιήθηκαν υγρές καλλιέργειες και σε άλλα πλασμίδια στα οποία δεν πραγματοποιήθηκε πέψη με περιοριστικά ένζυμα και πήγαν απευθείας για αλληλούχιση γιατί τα πρώτα πλασμίδια που στάλθηκαν για αλληλούχιση ήταν όλα διαφορετικά μεταξύ τους και έτσι δεν κρίθηκε σκόπιμο.

## 2. 6 Αλληλούχιση

Η αλληλούχιση των γονιδίων έγινε με ηλεκτροφόρηση τριχοειδούς αγγείου σε συσκευή αλληλούχισης τριχοειδούς αγγείου ABI 3700 (Applied Biosystems Inc., USA) στην εταιρεία MacroGen (Seoul, Korea). Για την αλληλούχιση χρησιμοποιήθηκαν εκκινητές (M13R και M13F) του πλασμιδίου που βρίσκονται εκατέρωθεν της θέσης εισαγωγής του γονιδίου στο πλασμίδιο. Για κάθε γονίδιο πήραμε δύο αλληλουχίες οι οποίες είχαν επικάλυψη 50-100 βάσεις κι έτσι έγινε η συνένωση των δύο τμημάτων καθ' ενός γονιδίου.

## 2.7 Φυλογενετική ανάλυση

Οι αλληλουχίες που πήραμε για κάθε γονίδιο συγκρίθηκαν με όλες τις γνωστές αλληλουχίες της GENBANK με τη βοήθεια του προγράμματος BLAST ώστε να βρεθούν οι κοντινότεροι συγγενείς με βάση την πρωτογενή δομή των γονιδίων και οι κοντινότεροι γνωστοί συγγενείς. Έγινε έλεγχος για τυχόν ύπαρξη χημικών αλληλουχιών με τη χρήση της CHIMERA\_CHECK του Ribosomal Database Project και απορρίφθηκαν. Έπειτα οι αλληλουχίες ευθυγραμμίστηκαν με τους ήδη γνωστούς συγγενείς με το λογισμικό ClustalW, ακολούθησε επεξεργασία με τη μέθοδο αποστάσεων Neighbour-Joining και διόρθωση με τη μέθοδο Jukes Cantor και στη συνέχεια τοποθέτηση των αλληλουχιών σε φυλογενετικό δέντρο. Οι κόμβοι του δέντρου ελέγχθηκαν με το πρόγραμμα PAUP 4.0 ώστε να προκύψει η βέλτιστη μορφή του δέντρου.

Η μέθοδος Neighbour-Joining είναι μια μέθοδος αποστάσεων. Με τη μέθοδο αυτή οι αποστάσεις εκφράζονται ως το ποσοστό των περιοχών που διαφέρουν ανάμεσα σε δυο αλληλουχίες σε μια πολλαπλή ευθυγράμμιση. Αποτελεί μια αλγοριθμική μέθοδο που γίνεται χρήση υπολογισμών που περιλαμβάνουν τον χειρισμό μιας μήτρας αποστάσεων που προκύπτει από τις πολλαπλές ευθυγραμμίσεις. Όταν ξεκινάει μια ευθυγράμμιση υπολογίζεται για κάθε ζεύγος αλληλουχιών η απόσταση ή το ποσοστό των διαφορών που καταγράφονται τα στοιχεία στη μήτρα των αποστάσεων (Hall, 2001).

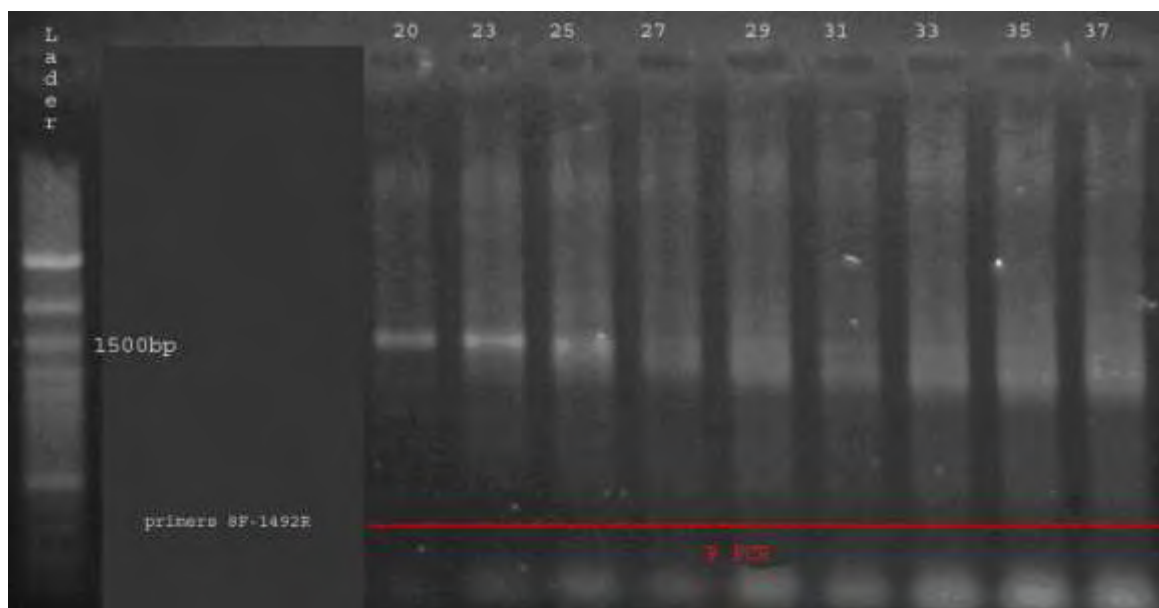
Το πρόγραμμα PAUP 4.0 που προαναφέρθηκε έχει τη δυνατότητα να δώσει στοιχεία που σχετίζονται με την στατιστική εγκυρότητα της τοπολογίας του δέντρου. Αυτό πραγματοποιείται με τη μέθοδο bootstrap. Με τη μέθοδο αυτή επιλέγονται κάθε φορά κάποιες αλληλουχίες από το δέντρο και κατασκευάζονται δέντρα έχοντας ως βάση αυτές τις αλληλουχίες. Η διαδικασία αυτή επαναλαμβάνεται πολλές φορές (100-1000) και τα αποτελέσματα συγκεντρώνονται ώστε να έχουμε στατιστική εγκυρότητα της κάθε ομαδοποίησης (Hall, 2001). Στην συγκεκριμένη εργασία η διαδικασία του bootstrap επαναλήφθηκε 1000 φορές για κάθε δέντρο.

Το φυλογενετικό δέντρο που κατασκευάστηκε έχει τη μορφή φυλογράματος. Σε ένα φυλόγραμμα όλοι οι απόγονοι ενός κοινού προγόνου απεικονίζονται με ένα κόμβο ανήκουν στον ίδιο κλάδο ή στην ίδια μονοφυλετική ομάδα. Από το φυλόγραμμα παίρνουμε πληροφορίες και για την σειρά των κλάδων και για τις γενετικές αποστάσεις μεταξύ των διαφόρων ομάδων.

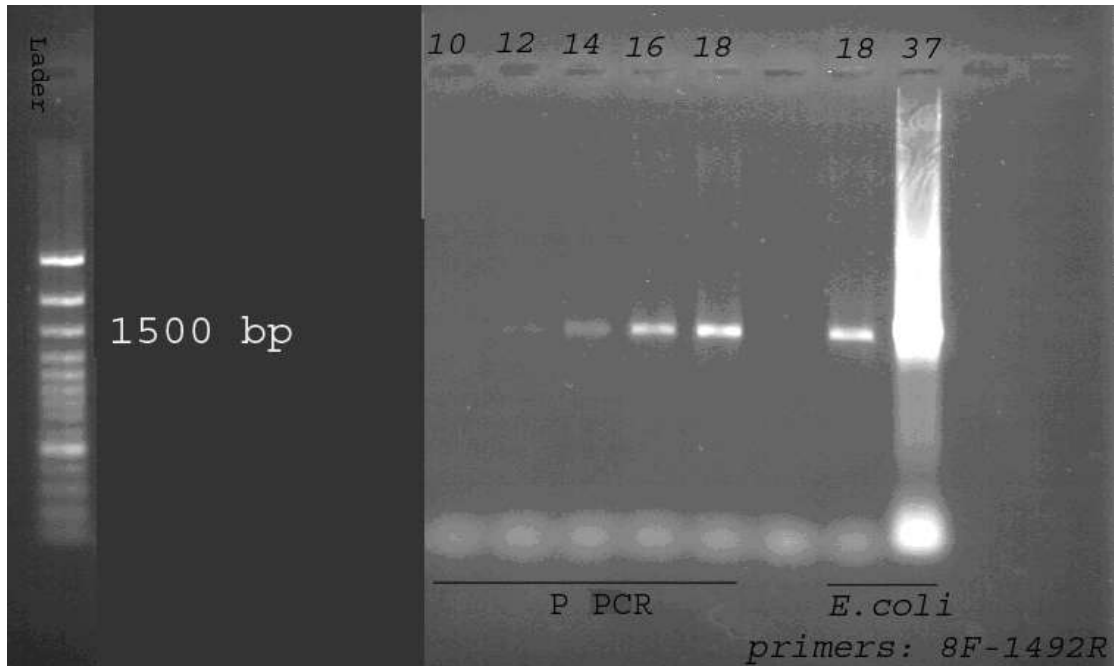


### 3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα αποτελέσματα από τις PCR που ακολουθούν μείωση των κύκλων παρατίθενται στις Εικόνες. 6, 7.

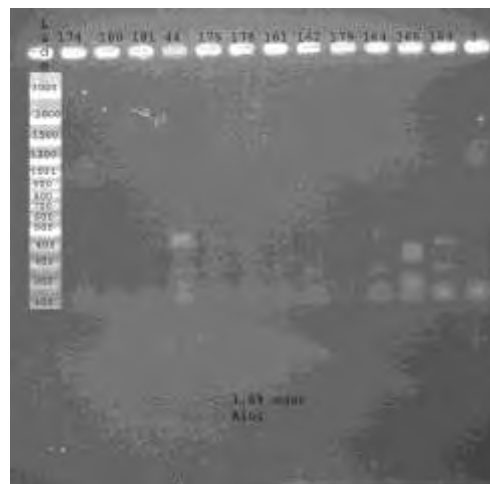
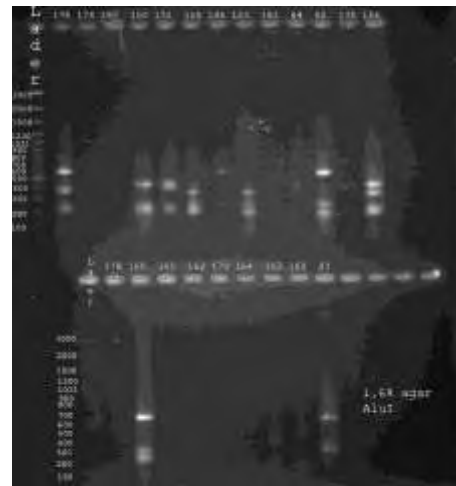
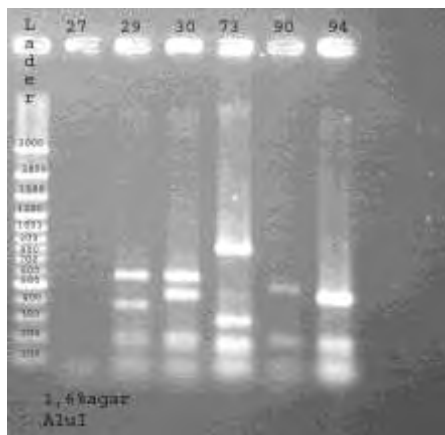
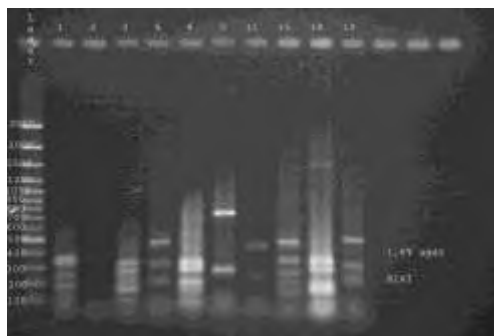


Εικόνα 6: Βελτιστοποίηση κύκλων από 37 σε 20 κύκλους. Επάνω παρουσιάζεται η πορεία μείωσης των κύκλων 37, 35, 33, 31, 29, 27, 25, 23, 20. Ως P PCR ονομάζονται τα προϊόντα PCR. Lader είναι ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 7 : Βελτιστοποίηση κύκλων από 18 σε 10 κύκλους. Επάνω παρουσιάζεται η πορεία μείωσης των κύκλων 18, 16, 14, 12, 10. Ως P PCR ονομάζονται τα προϊόντα PCR. Lader είναι ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε. + : Είναι το προϊόν PCR της *E. Coli* στους 18 και 37 κύκλους και - : το αρνητικό δείγμα.

Πραγματοποιήθηκε πέψη των προϊόντων της PCR που είχαν τις καλύτερες ζώνες με το περιοριστικό ένζυμο *AluI* (Εικόνα. 8). Το προϊόν της πέψης του ενζύμου ελέγχθηκε με ηλεκτροφόρηση.



Εικόνα 8: Αποτελέσματα από πέψη των προϊόντων της PCR (μετά την κλωνοποίηση) με το ένζυμο *AluI*. Αριθμημένα είναι τα προϊόντα PCR και Lader ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε.

Ακολουθεί πέψη με το περιοριστικό ένζυμο *Hinf* (Εικόνα. 9) σε πλασμίδια που έδωσαν παρόμοιες ζώνες με το *AluI* και σε αυτά που η ηλεκτροφόρηση δεν τα έδειξε καθαρά.



Εικόνα 9: Αποτελέσματα από πέψη του προϊόντος της PCR (μετά την κλωνοποίηση) με το ένζυμο *Hinf*. Αριθμημένα είναι τα προϊόντα PCR και Lader ο μάρτυρας που χρησιμοποιήθηκε.

Παρατηρούμε ότι με τα δυο ένζυμα που χρησιμοποιήθηκαν (*AluI*, *Hinf*) σε όλα τα δείγματα είχαμε διαφορετικά πρότυπα. Άρα αναμένεται μεγάλη βιοποικιλότητα βακτηρίων που απαντώνται στο ίζημα. Όλα τα δείγματα στάλθηκαν για αλληλούχιση αφού παρουσίαζαν διαφορετικά πρότυπα.

Με τη βοήθεια της πέψης με περιοριστικά ένζυμα πήραμε μια ποιοτική εικόνα της παρουσίας των διαφόρων βακτηρίων και μάλιστα διαπιστώσαμε πλήρη διαφορά μεταξύ των φυλοτύπων, αφού κάθε ένας εμφανίστηκε μια και μοναδική φορά. Για να έχουμε ασφαλή συμπεράσματα βασιζόμενοι σε αυτή τη μέθοδο θα πρέπει η πέψη να πραγματοποιηθεί σε ένα μεγαλύτερο αριθμό πλασμιδίων ώστε να εξασφαλιστεί

στατιστική εγκυρότητα. Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν αρκετοί κλώνοι και το κύριο ενδιαφέρον εστιάστηκε στην ποιοτική μελέτη των δειγμάτων.

Η στατιστική εγκυρότητα δεν εξαρτάται μόνο από τον αριθμό των κλώνων αλλά υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που μπορούν να την επηρεάσουν, χρησιμοποιώντας βιβλιοθήκες 16s rRNA γονιδίων. Μπορεί για παράδειγμα να έχουμε επιλεκτικότητα της PCR για ενίσχυση κάποιων γονιδίων ή εξαιτίας της διαφορετικής ικανότητας απομόνωσης κάποιων συγκεκριμένων μορίων DNA. (Ravenschlag et al, 1999)

Συγκεντρωτικά σε όλα τα δείγματα απαντήθηκαν οι παρακάτω ταξινομικές ομάδες.

Πίνακας 3: Απεικόνιση των ταξινομικών ομάδων που παρατηρήθηκαν.

Κλώνος	Ταξινομική ομάδα	Πλησιέστερη συγγενική αλληλουχία (% ομοιότητα) [αριθμός πρόσβασης GenBank]	Περιγραφή/ενδιαίτημα	Πλησιέστερη συγγενική αλληλουχία γνωστού μικροοργανισμού (% ομοιότητα) [αριθμός πρόσβασης GenBank]
Kas2B	Acidobacteria	Κλώνος SS_LKC22_UB76 (90%) [AM180890]	Μικροβιακός τάπητας σπηλαίου	-
Kas3B	-	Κλώνος 409 (94%) [AY493905]	Συσσωματώματα εδάφους	-
Kas5B	-	Κλώνος: LS4-147 (<96%)[AB234243]	Τζημα μολυσμένο με πολυχλωριωμένες διοξείνες	-
Kas 6B	Chlorobi	Κλώνος;397 (93%) [AB252951]	Στη λιμνοθάλασσα Shibayama, Shikawa, Ιαπωνία	-

Kas 9B	-	Κλώνος CCM11a (91%)(AY221041)	Σπήλαιο Mammoth, KY, USA	-
Kas 11mB	-	Κλώνος 17 (97%) [DQ413076]	Αερόβιο/αναερόβιο SBR αντιδραστήρα	<i>Strerolibacterium denitrificans</i> (92%) [AJ306683]
Kas 15 B	-	Κλώνος BS049 (96%) [AB240238]	Ριζόσφαιρα από <i>Phragmites</i>	<i>Prolixibacter bellariavorans</i> (88%) [AY918928]
Kas 18B	-	Κλώνος SZB49 (93%) [AM176893]	Μαγκρόβιο ίζημα	-

Kas 19B	Chloroflexi	Σε ακαλλιέργητη υδροανθρακική πηγή βακτηρίων BPC110 (91%) [AF154084]	Ίζημα πηγής	Μεθανογόνο μικροβιακό συσσωμάτωμα αποικοδόμησης τολουενίου (91%) [AF423184]
Kas 27B	-	α.Κλώνος LS4-227 (97%) [AB234247]	Ρυπασμένο ίζημα	-
Kas 30B	-	Κλώνος cSLKS 1 (96%) [AM086102]	Ίζημα της μεσότροφης λίμνης Kinneret, Ισραήλ	<i>Candidatus Competibacter</i> (93%) [AY962318]
Kas 62mB	-	β- proteobacterium Κλώνος : 187 (99%) [AB252908]	Σε ολιγοτροφικά μικροβιακά κύτταρα	<i>Aquicola tertiarycarbonis</i> (97%) [DQ656489]

Kas 73mB	-	Κλώνος mle1-8 (91%) [AF280847]	Μεσόφιλοι και θερμόφιλοι βιοαντιδραστήρες	-
Kas 105B	-	Κλώνος 188up (98%) [AY212640]	Περιτώματα αλόγου	<i>Aquomonas fontana</i> (96%) [AB120965]
Kas 106B	—	κλώνος TA10 (96%)[AF229783]	Σε αναερόβια κοκκώδη λάσπη υποβαθμισμένη σε άλας του τερφθαλικού οξέως	-
Kas 137B	Proteobacteria	β- proteobacterium (96%) [AB252914]	Λιμνοθάλασσα Shibayama, Ishikawa, Ιαπωνία	-



Kas 139B	Fibrobacteres	Ακαλλιέργητο <i>Fibrobacteres</i> bacterium Κλώνος:230 (88%) [AB252949]	Λιμνοθάλασσα Shibayama, Ishikawa, Ιαπωνία	<i>Geobacter pelophilus</i> (90%) [U96918]
Kas 142B	Proteobacteria, Betaproteobacteria	Bacterium Ellin6067 (96%) [AY234719]	Εργαστηριακή καλλιέργεια	<i>Messilia timonae</i> (90%) [AY512824]
Kas 145B	-	Κλώνος VHS-B5-10 (89%) [DQ395029]	Τζιμα στο λιμάνι Victoria, Αφρική	-
Kas 146B	-	Κλώνος ML-9-70.2 (94%) [DQ520192]	Σε λίμνη γλυκού νερού στην Κίνα	<i>Methylocaldum gracile</i> (93%) [U89298]

Kas 147B	-	Κλώνος SJA-4 (88%) [AJ009448]	Μικροβιακό συσσωμάτωμα αποικοδόμησης τριχλωροβενζενίου	-
Kas 148B	-	Κλώνος LS4-226 (91%) [AB234282]	Ρυπασμένο ίζημα	<i>Spirochaeta africana</i> (92%) [X93928]
Kas 149B	-	Κλώνος C17.11WL (98%) [AF432618]	Ριζόσφαιρα του πεύκου <i>Pinus contorta</i> σε έδαφος του δάσους Columbia, Αγγλία	-
Kas 150B	Verrucomicrobia	Bacterium <i>Ellin514</i> (90%) [AY960777]	Έδαφος	-

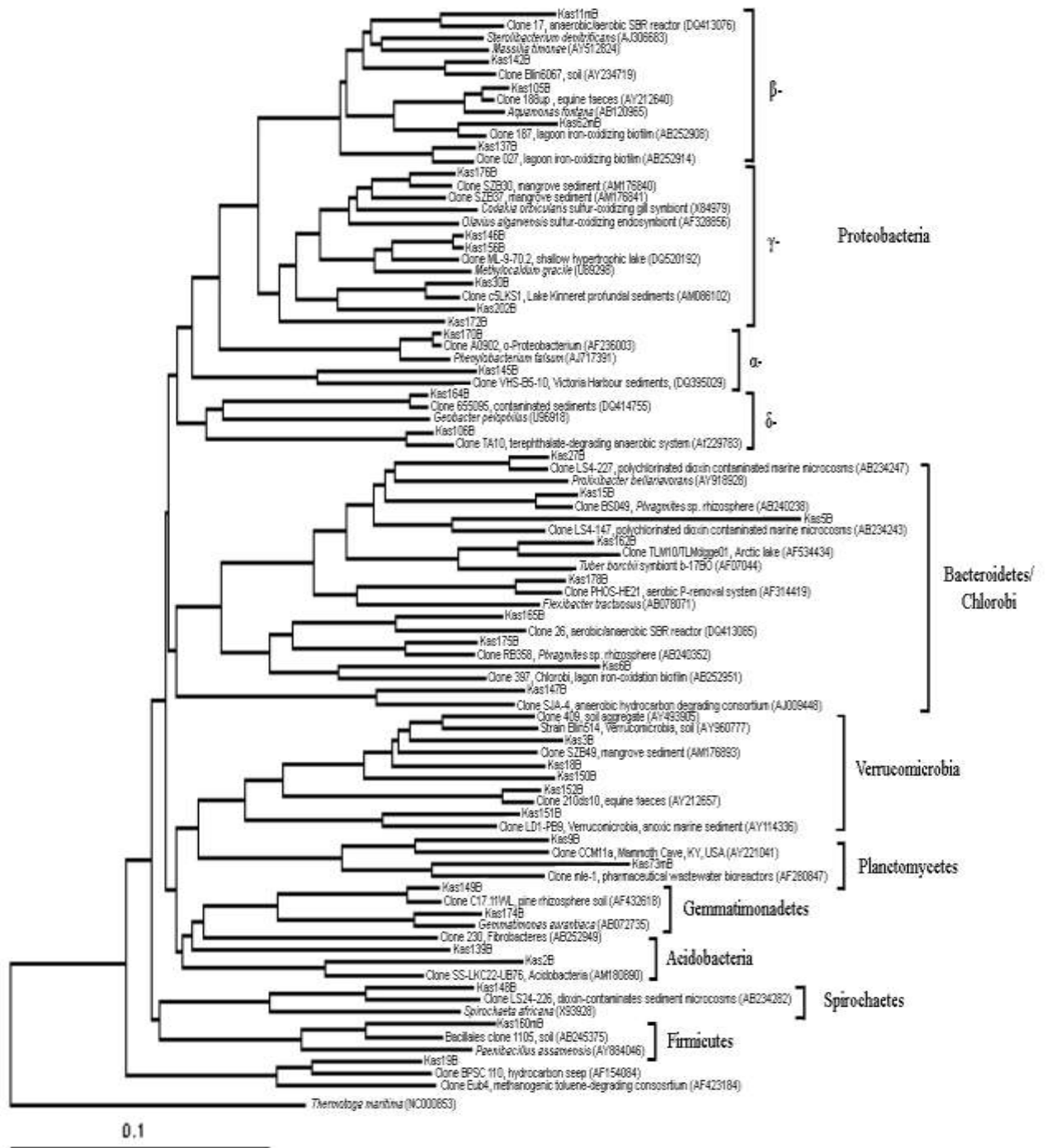
Kas 151B	Verrucomicrobia	<i>Verrucomicrobia</i> bacterium κλώνος LD1_PB9 (90%) [AY114336]	Ανοξικό θαλάσσιο ίζημα	-
Kas 152B	-	Κλώνος 210ds10 (97%) [AY212657]	Περιττώματα αλόγου	-
Kas 156B	-	Κλώνος ML-9-70.2 (94%) [DQ520192]	Ρηχή υπερτροφική λίμνη στην Κίνα	<i>Methylocaldum gracile</i> (93%) [U89298]
Kas 160mB	Firmicutes (Bacillales)	<i>Bacillales</i> bacterium Gsoil 1105 (95%) [AB245375]	Χώμα αγρού με πιπερόριζες ( <i>ginseng</i> )	<i>Paenibacillus assamensis</i> (92%) [AY884046]

Kas 162B	-	Κλώνος TLM10/TLMdgge01 (94%) [AF534434]	Αρκτική λίμνη με εποχικές διαφορές στις πηγές οργανικού υλικού	Συμβιώτης του <i>Tuber borchii</i> (92%) [AF070444]
Kas 164B	-	Κλώνος 655095 (98%) [DQ404755]	Ρυπασμένα ιζήματα	-
Kas 165	-	Κλώνος 26 (92%) [DQ413085]	Αερόβιο/αναερόβιο SBR αντιδραστήρα	-
Kas 170B	Proteobacteria, Alphaproteobacteri a	Alpha proteobacterium AO902 (98%) [AF236003]	Άγνωστης προέλευσης	<i>Phenylobacterium falsum</i> (97%) [AJ717391]

Kas 172B	-	Κλώνος S1-4-CL1 (98%) [AY725260]	Άγνωστης προέλευσης	-
Kas 174 B	Gemmatimonadetes	Gemmatimonas aurantiaca (95%) [AB072735]	Άγνωστης προέλευσης	-
Kas 175B	-	Κλώνος RB358 (94%) [AB240352]	Ριζόσφαιρα από <i>Phragmites</i>	-
Kas 176B	-	Κλώνος SZB30 (96%) [AM176840]	Μαγκρόβια ιζήματα	Συμβιωτής του <i>Codakia orbicularis</i> (91%) [X84979]

Kas 178 B	-	Ακαλλιέργητο βακτήριο PHOS-HE21 (96%) [AF314419]	Αερόβιο οικοσύστημα μεταβαλλόμενου φωσφόρου	<i>Flexibacter tractuosus</i> , (87%) [AB078071]
Kas 202B	-	Κλώνος SZB7 (89%) [AM176841]	Μαγκρόβια ιζήματα	Θειο-οξειδωτικός ενδοσυμβιώτης του <i>Olavius algarvensis</i> (89%) [AF328856]

Από τις αλληλουχίες που προέκυψαν και με την διαδικασία που αναφέρεται στη μεθοδολογία κατασκευάστηκε το δέντρο των φυλοτύπων (Εικόνα 10).



Εικόνα 10: Το δέντρο φυλοτύπων για το δείγμα ιζήματος. Η γραμμή στο τέλος της εικόνας αποδεικνύει ότι στο συγκεκριμένο μήκος κλαδιού αντιστοιχούν 0,10 αλλαγές ανά νουκλεοτίδιο.

#### 4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η βακτηριακή ποικιλότητα σε δείγμα ιζήματος από τη λίμνη της Καστοριάς. Όπως έχει ήδη αναφερθεί βρέθηκαν συγγενείς φυλότυποι αρκετών διαφορετικών ομάδων. Όπως φαίνεται και στον πίνακα III βρέθηκαν πολλοί αντιπρόσωποι από κλάσεις των Proteobacteria αλλά και αντιπρόσωποι των φύλων Acidobacteria, Chlorobi, Chloroflexi, Firmicutes (Bacillales), Spirochaetes, Gemmatimonadetes, και Verrucomicrobia. Θεωρούμε ότι ένας φυλότυπος ανήκει στο ίδιο είδος με κάποιον άλλο όταν το ποσοστό της ομοιότητας των αλληλουχιών ξεπερνά το 97% και στο ίδιο γένος όταν το ποσοστό ξεπερνά το 90%. (Stackenbrandt and Goebel, 1994).

Ο φυλότυπος Kas 2B ανήκει στο φύλο Acidobacteria. Ο κλώνος Kas 6B έχει υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας με κλώνο που ανήκει στα *Chlorobi* και έχει εντοπιστεί στη λιμνοθάλασσα Shibayama στην Ιαπωνία (Sakurai et al, 2006). Ο φυλότυπος Kas 11mB ανήκει στο γένος *Sterolibacterium* και έχει ως κοντινότερο γνωστό μικροοργανισμό το *Sterolibacterium denitrificans* που ανήκει στο φύλο των  $\beta$ -Proteobacteria. Το γένος αυτό περιλαμβάνει μεσόφιλα και χημει-οργανοετερότροφα είδη (Tarlera and Denner, 2003). Ο Kas 19B έχει ομοιότητα με αλληλουχία βακτηρίου που ανήκει στο φύλο Chloroflexi.

Ο φυλότυπος με το υψηλότερο ποσοστό ομοιότητας είναι ο Kas 62mB που σχεδόν ταυτίζεται με κλώνο που ανήκει στα  $\beta$ -Proteobacteria που έχει εντοπιστεί σε ολιγοτροφικά μικροβιακά κύτταρα (Sakurai et al, 2006) και έχει υψηλό ποσοστό ομοιότητας με το *Aquicola tertiarycarbonis* (για το οποίο δεν έχει γίνει δημοσίευση).

Ο Kas 137 B ανήκει στην κλάση των  $\beta$ -Proteobacteria και η όμοια του αλληλουχία έχει εντοπιστεί στη λιμνοθάλασσα Shibayama στην Ιαπωνία (Sakurai et al, 2006).



Ο Kas 139 B έχει χαμηλό ποσοστό ομοιότητας με κλώνο που ανήκει στα *Fibrobacteres* αλλά έχει μεγαλύτερο ποσοστό ομοιότητας με το *Geobacter pelophilus* και έτσι ανήκει στην κλάση β-Proteobacteria.

Ο φυλότυπος Kas 142B ανήκει επίσης στην κλάση των β-Proteobacteria. Το πλησιέστερα συγγενικό του γνωστό είδος είναι το *Messilia timonae* που μέχρι σήμερα είχε αποκλειστικά απομονωθεί από άνθρωπο (αίμα, εγκεφαλονωτιαίο υγρό και κόκκαλα) (Lindquist et al, 2003) . Η αλληλουχία Kas 146B και η Kas 156B ανήκουν στο γένος *Methylocaldum* και στην κλάση γ- Proteobacteria και ως κοντινότερο γνωστό μικροοργανισμό έχουν το *Methylocaldum gracile*. που έχει ως ευνοϊκές συνθήκες ανάπτυξης πολύ υψηλές θερμοκρασίες (40 ° C και έχει εντοπιστεί σε αγροτικό έδαφος και σε παραπόταμο με πολύ υψηλή θερμοκρασία (Bodrossy et al, 1997).

Ο φυλότυπος Kas 148B ανήκει στο γένος *Spirochaeta* και στο φύλο Spirochaetes αφού έχει ομοιότητα με το *Spirochaeta africana*. Το γένος αυτό περιλαμβάνει πολλά είδη που έχουν απαντηθεί σε θαλάσσια λάσπη. Πολλά από αυτά είναι ανερόβια, ελεύθερα διαβιούντα ή παράσιτα (Zhilina et al, 1996).

Ο φυλότυπος Kas 105B ανήκει στο γένος *Aquamonas* και στην κλάση β-Proteobacteria αφού έχει υψηλή ομοιότητα με το *Aquamonas fontana* (Για το είδος αυτό δεν έχει μέχρι σήμερα πραγματοποιηθεί απομόνωση). Ο Kas 150B ανήκει στο φύλο Verrucomicrobia και η κοντινότερη σε αυτόν αλληλουχία έχει εντοπιστεί στο έδαφος, αν και οι περισσότεροι αντιπρόσωποι έχουν εντοπιστεί σε υδάτινα οικοσυστήματα (Alain et al, 2002), όπως και ο Kas 151B που όμως η κοντινότερη σε αυτόν αλληλουχία έχει εντοπιστεί σε ανοξικό θαλάσσιο ίζημα.

Ο Kas 160mB ανήκει στο γένος *Bacillus* και στο φύλο Bacillales και η κοντινότερη συγγενής του αλληλουχία έχει εντοπιστεί σε χώμα αγρού με πιπερόριζες. Το γένος αυτό

είναι ένα μέλος της διαίρεσης Firmicutes. Περιλαμβάνει υποχρεωτικά ή μη αερόβια είδη, ευρύτατα διαδεδομένα στη φύση. Είναι είδη ελεύθερα διαβιούντα και συχνά παθογόνα.

Βρέθηκε ένας φυλότυπος (Kas 170B) που ανήκει στην κλάση των  $\alpha$ -Proteobacteria και έχει ως πλησιέστερο γνωστό βακτήριο του γένους *Phenylobacterium*, το *Phenylobacterium falsum* που παρουσιάζει ως ιδανικές συνθήκες ανάπτυξης θερμοκρασία 35 ° C και Ph 8 (Tiago et al, 2005). Τέλος ο φυλότυπος Kas 174B ανήκει στο φύλο Gemmatimonadetes και συγκεκριμένα στο γένος *Gemmatimonas* αφού έχει αρκετά υψηλό ποσοστό συγγένειας με το *Gemmatimonas aurantiaca*. Πρόκειται για μεσόφιλους μικροοργανισμούς που αναπτύσσονται κάτω από αερόβιες συνθήκες (Zhang et al, 2003).

Ο μεγαλύτερος αριθμός από τις αλληλουχίες που προσδιορίστηκαν ανήκουν στο φύλο των Proteobacteria και ειδικά στην κλάση  $\beta$ -Proteobacteria. Αποτελεί ίσως τη μεγαλύτερη ομάδα βακτηρίων. Διαιρείται σε πέντε κλάσεις ( $\alpha, \beta, \gamma, \delta, \epsilon$ ). Οι  $\beta, \gamma$  είναι κυρίως θειοβακτήρια που ανέχονται υψηλές συγκεντρώσεις υδροθείου. Ακόμα και σε αυτά όμως οι πολύ υψηλές συγκεντρώσεις είναι τοξικές. Οι κλάσεις  $\delta, \epsilon$  δεν φωτοσυνθέτουν αλλά είναι χημειοργανότροφα. Τέλος όπως είναι γνωστό τα  $\beta$ -Proteobacteria απαντώνται γενικά σε υψηλά ποσοστά όταν παρατηρούνται μεγάλες ποσότητες άνθρακα ενώ παράλληλα τα  $\alpha$ -Proteobacteria είναι περισσότερο ευαίσθητα στο όζον (Mezzanotte et al, 2004)

Η συλλογή του ιζήματος επιλέχθηκε να πραγματοποιηθεί το μήνα Οκτώβριο, όπου η θερμοκρασία διατηρείται ακόμα σε υψηλά επίπεδα. Οι συνθήκες θρεπτικών στη λίμνη ευνοούν το φαινόμενο του ευτροφισμού και αναμέναμε την παρουσία κυανοβακτηρίων

στο ίζημα, αφού όπως είναι γνωστό ο ευτροφισμός ευνοεί την παρουσία κυανοβακτηρίων.

Τα τελευταία χρόνια έχει γίνει σαφές ότι οι λίμνες περιέχουν σχεδόν μόνιμους βακτηριακούς "κατοίκους". Συγκεκριμένες ομάδες βακτηρίων απαντώνται σε πολλές λίμνες και ποτάμια σε όλο τον κόσμο ενώ παράλληλα παρατηρούνται σπάνια σε θαλάσσια και χερσαία συστήματα. Πολύ συχνά επίσης κάποια από αυτά τα βακτήρια κυριαρχούν στο σύστημα. Στις μέρες μας πολλά από αυτά τα βακτήρια έχουν αντισταθεί στην εργαστηριακή καλλιέργεια τους ενώ αποτελεί μια βασική μέθοδο χαρακτηρισμού τους. Για το λόγο αυτό μελετώνται οι ιδανικές συνθήκες για κάθε είδος.

Τα βακτηριακά φύλα που εντοπίστηκαν στην παρούσα εργασία σχετίζονται με βακτήρια που έχουν κατά κύριο λόγο εντοπιστεί και σε άλλα λιμναία συστήματα ή στο έδαφος που αποτελεί μακροχρόνια αποθήκη οργανικού υλικού.

Από τον πίνακα 3 παρατηρείται ότι οι κλώνοι με γνωστή συγγενική αλληλουχία γνωστών βακτηρίων είναι περιορισμένοι. Παρατηρείται λοιπόν μια αξιοπρόσεκτη βιοποικιλότητα και συγγένεια με ακαλλιέργητους κλώνους.

Με μια πρώτη εικόνα μπορεί εύκολα κανείς να καταλάβει ότι δεν υπάρχουν παρόμοιοι κλώνοι σε ποσοστό μεγαλύτερο του 97%. Όπως προαναφέρθηκε τα δείγματα συλλέχθηκαν από ίζημα ρηχής λίμνης και το έδαφος ευνοεί την ποικιλότητα αν υπολογίσει κανείς ότι σε 1 gr χώματος μπορούν να εντοπιστούν χιλιάδες είδη βακτηρίων ειδικά σε συνθήκες ευτροφισμού όπου ο μικροβιακός βρόχος είναι ισχυρός και παρατηρούνται πολλά προτόζωα και βακτήρια με ιδιαίτερες βιολογικές διεργασίες.

Η μεγάλη ποικιλότητα λοιπόν μπορεί να εξηγήσει το μεγάλο αριθμό των άγνωστων μέχρι σήμερα βακτηρίων.

Η πιο σημαντική παρατήρηση που προκύπτει από την ολοκλήρωση του πειράματος είναι ότι δεν ανιχνεύθηκε κανένα είδος κυανοβακτηρίου στο ίζημα ενώ βρισκόμαστε σε μια λίμνη με υδάτινη στήλη πλούσια σε κυανοβακτήρια. Αναμενόταν κάποια από αυτά να καθιζάνουν στο ίζημα και να εντοπιστούν σε μεγάλο μάλιστα ποσοστό αφού το ίζημα αποτελεί μακροχρόνια αποθήκη οργανικού υλικού. Οι λόγοι για τους οποίους δεν ανιχνεύθηκαν δεν μπορούν να διευκρινιστούν απόλυτα αλλά πιθανά τα κυανοβακτήρια βρίσκονται σε τόσο μικρό ποσοστό που δεν επέτρεψε να ανιχνευθούν ή δεν καθιζάνουν στο ίζημα όπως αναμέναμε αλλά "ξεπλένονται" με κάποιο τρόπο από τη λίμνη (για παράδειγμα μέσω του θυροφράγματος) .

Σε εργασία του Δρ Μ. Heldal (<http://www.nioo.knaw.nl>, Σεπτέμβριος 2006) στο Πανεπιστήμιο της Νορβηγίας μελετήθηκε η αιτία κατάρρευσης πληθυσμού κυανοβακτηρίων σε 97 λίμνες στην Ισπανία, στο Βέλγιο, στην Ολλανδία και στη Δανία. Με στατιστική ανάλυση που βασιζόταν στην μεταβολή περιβαλλοντικών παραμέτρων παρατηρήθηκε ισχυρή επίδραση στην κοινότητα των βακτηρίων από το φυτοπλαγκτόν που υπάρχει σε μια λίμνη, παράγοντας που μπορεί να επηρέασε και τον πληθυσμό των κυανοβακτηρίων στο ίζημα της Καστοριάς.

Μια ακόμα πολύ σημαντική παρατήρηση του προαναφερθέντος πειράματος μπορεί να αποτελεί εξήγηση την απουσίας κυανοβακτηρίων. Πρόκειται για την παρουσία ιών που ενδέχεται να προκάλεσαν την κατάρρευση του πληθυσμού των κυανοβακτηρίων στο ίζημα. Οι ιοί αυτοί είναι γνωστοί ως κυανοφάγοι και μπορούν να δρουν σε κάθε περίοδο του έτους. Το αιφνίδιο φαινόμενο της εξαφάνισης κυανοβακτηρίων έχει καταγραφεί σε πολλές κυρίως ρηχές λίμνες.

Κύρια μαρτυρία για την κατάρρευση των κυανοβακτηρίων από τον ιό αυτό αποτέλεσε η παρατήρηση στο ηλεκτρονικό μικροσκόπιο λεπτών τμημάτων των κυττάρων των

κυανοβακτηρίων που δείχνει ότι προέρχεται από ιό. Ένας ακόμα τρόπος επιβεβαίωσης της κατάρρευσης μπορεί να είναι η οπτική παρατήρηση όπου παρατηρείται εξαφάνιση των χρωστικών στα κυανοβακτήρια ενώ οι χρωστικές των φυκών που περιέχουν χλωροφύλλη παραμένουν ορατές (<http://www.nioo.knaw.nl>, Σεπτέμβριος 2006).

Με την εργασία αυτή μελετήσαμε ένα μέρος της βακτηριακής ποικιλότητας σε ίζημα λίμνης πλούσιας σε κυανοβακτήρια. Δεν είχαμε μοριακά αποτυπώματα κυανοβακτηρίων που αναμέναμε και αυτό θα μπορούσε να αποτελέσει αντικείμενο πιο επισταμένης έρευνας, ώστε να εξηγηθεί η απουσία τους, πιθανά και σε περισσότερα δείγματα καθώς και η εξέταση πιθανής παρουσίας κυανοφάγων που μπορεί να προκάλεσαν την απουσία τους. Θα μπορούσε επίσης να εξεταστεί ένας μεγαλύτερος αριθμός κλώνων ώστε να έχουμε μια καλή στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

Πολύ σημαντική ίσως θα μπορούσε να είναι η μελέτη δειγμάτων και με άλλες τεχνικές της rRNA προσέγγισης. Θα μπορούσαν επίσης να χρησιμοποιηθούν ιχνηθέτες για τους φυλότυπους που ανιχνεύθηκαν καθώς και για όσους περιμέναμε αλλά δεν ανιχνεύθηκαν. Τέλος θα ήταν πολύ ενδιαφέρουσα η χρήση primers για τυχόν παρουσία μεθανογενών μικροοργανισμών των αρχαίων (Archaea).

## 5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abou-Shanab R.A., Delorme T.T., Angle S.J., Chaney R.L., van Berkum P., Ghazlan H.A., Ghanem K., and Moawad H.A. (2003). Molecular Characterization and Identification of nickel-resistance soil bacteria in the rhizosphere of *Alyssum murale*, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).
- Abulencia C.B., Wyborski D.L., Garcia J.A., Podar M., Chen W., Chang S.H., Chang H.W., Watson D., Brodie E.L., Hazen T.C., and Keller M. (2006). Environmental whole-genome amplification to access microbial populations in contaminated sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 72:3291-3301.
- Alain K., Olagnon M., Debruyeres D., Page A., Barbier G., Juniper S.K., Querellou J., and Gambon-Bonavita M.A. (2002). Phylogenetic characterization of the bacterial assemblage associated with mucous secretions of the hydrothermal vent polychaete *Paralvinella palmiformis* FEMS Microbiology Ecology, 42:463-476.
- Amann R.I., Ludwig W., and Schleifer K.H. (1995). Phylogenetic identification and in situ detection of individual microbial cells without cultivation. *Microbiological Reviews*: 143-169.
- Barbieri E., Potenza L., Rossi I., Sisti D., Giomaro G., Rossetti S., Beimfohr C., and Stocchi V. (2000). Phylogenetic characterization and in situ detection of a Cytophaga-Flexibacter-Bacteroides phylogroup bacterium in *Tuber borchii* Vittad, ectomycorrhizal mycelium. *Applied and Environmental Microbiology*, 62:3005-3010.
- Bernard P., Gabant P., Bahassi E.M., and Couturier M. (1994). Positive-selection vectors using the F plasmid *ccdB* killer gene, *Gene* 148: 71–74.

- Bodrossy L., Holmes E.M., Holmes A.J., Kovacs K.L., and Murrell J.C. (1997). Analysis of 16S rRNA and methane monooxygenase gene sequences reveals a novel group of thermotolerant and thermophilic methanotrophs, *Methylocaldum* gen. nov. Archives of Microbiology, 168:493-503.
- Carmichael W.W (1992). Cyanobacteria secondary metabolites the cyanotoxins. Journal of Applied Bacteriology, 72:445-459.
- Chee-Sanford J.C., Connor L.M., Holman T.J., and Sims G.K. (2004). Direct Submission, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).
- Chow M.L., Radomski C.C., McDermott J.M., Davies J., and Axelrood P.E. (2002). Molecular characterization of bacterial diversity in Lodgepole pine (*Pinus contorta*) rhizosphere soils from British Columbia forest soils differing in disturbance and geographic source. Ecology, 42: 347-357.
- Cook C., Vardaka E., and Lanaras T. (2004). Toxic Cyanobacteria in Greek Freshwaters 1987-2000. Occurrence, toxicity and impacts in the Mediterranean region. Acta Hydrochimica et Hydrobiologia, 32:107-124.
- Crump B.C., Kling G.W., Bahr M., and Hobbie J.E. (2002). Bacterioplankton community shifts in an arctic lake correlate with seasonal changes in organic matter source. Applied and Environmental Microbiology, 69:2253-2268.
- Dabert P., Sialve B., Delgenes J.P., Moletta R., and Godon J.J. (2001). Characterisation of the microbial 16S rDNA diversity of an aerobic phosphorus-removal ecosystem and monitoring of its transition to nitrate respiration. Applied Microbiology and Biotechnology, 55: 500-509.
- Domingos P., Rubim T.K., Molica R.J.R., Azevedo O.M.F.O., and Carmichael W.W. (1999). First report of microcystin production by picoplanktonic cyanobacteria

- isolated from Northeast Brazilian drinking water supply. *Environmental Toxicology*, 14: 31-35.
- Dubilier N., Mulders C., Ferdelman T., Beer D., Pernthaler A., Klein M., Wagner M., Erseus C., Thiermann F., Krieger J., Giere O., and Amann R. (2001). Endosymbiotic sulphate-reducing and sulphide-oxidizing bacteria in an oligochaete worm. *Nature*, 411:298-302.
- Durand P., Gros O., Frenkiel L., and Prieur D. (1996). Phylogentic characterization of sulfur-oxidizing bacterial endosymbionts in three Carribean Lucinidae by using 16S rDNA sequences analysis. *Molecular Marine Biology and Biotechnology*, 5:37-42.
- Fowler R., Roberson E., Groves C., and Sahi S. (2003). Survey of bacteria from Mammoth Cave, KY by molecular analysis of 16S rRNA genes, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).
- Freitag T.E., and Prosser J.I. (2002). Community Structure of Ammonia-Oxidizing Bacteria within anoxic marine sediments. *Applied and Environmental Microbiology*, 69:1359-1371.
- Hall B.G. (2001). *Phylogenetic trees made easy*. 1<sup>st</sup> edition, release, Sinauer associates, Inc-Publishers Sunderland, Massachusetts, USA.
- Hiraishi A., Kaiya S., Miyakoda H., and Futamata H. (2005). Biotransformation of polychlorinated dioxins and microbial community dynamics in sediment microcosms at different contamination levels. *Microbes and Environment*, 20: 227-242.
- Holmes D.E., Nevin K.P., Woodard T.L., and Lovley D.R. (2005). *Prolixibacter bellariavorans* gen. nov., sp. nov. a sugar fermenting psychrotolerant anaerobe in



the Bacteroidetes group isolated from a marine sediment fuel cell, (www.ncbi.nlm.nih.gov/, πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).

Im W., and Lee S. (2005). Comparative analysis of bacterial diversity in the soil of the ginseng field by molecular and cultivation-based technique, (www.ncbi.nlm.nih.gov/, πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).

Jeon C.O., and Lu S. (2006). Comparative analysis of microbial communities from culture-dependent and -independent approaches in an anaerobic/aerobic SBR Reactor, (www.ncbi.nlm.nih.gov/, πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).

Joseph S.J., Hugenholtz P., Sangwan P., Osborne C.A., and Janssen P.H. (2003). Laboratory cultivation of widespread and previously uncultured soil bacteria. Applied and Environmental Microbiology, 69: 7210-7215.

Kim J.S., and Crowley D.E. (2003). Fingerprinting bacterial communities in soil aggregates, (www.ncbi.nlm.nih.gov/, πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).

Lanaras T., and Cook C.M. (1994). Toxin extraction from an *Anabaenopsis milleri*-dominated bloom. Science of the Total Environment, 142: 163-169.

Lanaras T., Tsitsamis S., Chlichlia C., and Cook C.M. (1989). Toxic cyanobacteria in Greek freshwaters. Journal of Applied Phycology, 1: 67-73.

Lapara T.M., Nakatsu C.H., Pantea L., and Alleman J.E. (2000). Phylogenetic analysis of bacterial communities in mesophilic and thermophilic bioreactors treating pharmaceutical wastewater. Applied and Environmental Microbiology, 66: 3951-3959.

Lechner U., Brodkorb D., Hause G., Haertig C., Auling G., Fayolle-Guichard F., Monot F., Mueller R.H., and Rohwerder T. (2006). *Aquicola tertiaricarbonis* gen. nov.,

sp. nov., a tertiary butyl moieties degrading bacterium, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).

Liang J.B., Lan C.Y., Tam N., Zhan Q.J., and Huang L.N. (2005). Recovery of novel bacterial diversity from mangrove sediment, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).

Lindquist D., Murrill D., Burran W.P., Winans G., Janda J.M., and Probert W. (2003). Characteristics of *Massilia timonae* and *Massilia timonae*-like Isolates from human patients, with an emended description of the species. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:192-196.

Mezzanotte V., Prato N., Sgorbati S., and Citterio S. (2004). Analysis of microbiological characteristics of wastewater along the polishing sequence of a treatment plant. *Water Environment Research*, 76:463-7.

Mitsutani A., Imoto A., and Shinkai K. (2000). Unidentified alpha proteobacterium, 16S rRNA gene, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).

Moustaka-Gouni M. (1993). Phytoplankton succession and diversity in a warm monomictic, relatively shallow lake: Lake Volvi, Macedonia, Greece. *Hydrobiologia*, 249:33-42.

Moustaka-Gouni M., and Nikolaidis G. (1990). Phytoplankton of a monomictic lake – Lake Vegoritis, Greece. *Archives of Hydrobiology*, 119: 299-313.

Nakagawa Y., Sakane T., Suzuki M., and Hatano K. (2002). Phylogenetic structure of the genera *Flexibacter*, *Flexithrix*, and *Microscilla* deduced from 16S rRNA sequence analysis. *Journal of General and Applied Microbiology*, 48:155-165.

- Nakamura Y., Satoh H., and Okabe S. (2005). Analysis of microbial community structure in rhizosphere of *Phragmites*, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).
- Olsen G.J., Giovannoni S.J., Pace N.R., and Stahl D.A. (1986). Microbial ecology and evolution: a ribosomal RNA approach. *Annual Reviews of Microbiology*, 40:337-365.
- O'Neill K.R., Hinton S.M., Sowlay M.R., and Colwell R.R. (1999). 16S rRNA analysis of hydrocarbon seep sediment, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).
- Ravenschlag K., Sahm K., Pernthaler, and Amann R. (1999). High bacterial diversity in permanently cold marine sediments, *Applied and Environmental Microbiology*, 66:3982-3989.
- Saha P., Mondal A.K., Mayilraj S., Krishnamurthi S., Bhattacharya A., and Chakrabarti T. (2005). *Paenibacillus assamensis* sp. nov., a novel bacterium isolated from a warm spring in Assam, India. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 55:2577-2581.
- Sakurai K., Tazaki K., and Yamaguchi K. (2006). Identification of bacteria in an iron-oxidation biofilm at Shibayama lagoon, Ishikawa, Japan, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).
- Sangwan P., Kovac S., Davis K.E.R., Sait M., and Janssen P.H. (2005). Detection and cultivation of soil, Verrucomicrobia. *Applied and Environmental Microbiology*, 71: 8402-8410.

- Schwarz J.I.K., Eckert W., and Conrad R. (2005). Abundance and phylogenetic diversity of Bacteria and Archaea in the profundal sediment of mesotrophic Lake Kinneret, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).
- Simpson J.M., Santo Domingo J.W., and Reasoner D.J. (2003). Assessment of equine fecal contamination: the search for alternative bacterial source-tracking targets. *FEMS Microbiological Ecology*, 47:65-75.
- Sivonen K., and Jones G. (1999). Cyanobacterial toxins. In: Chorus I, Bartram J (Eds.): *Toxic Cyanobacteria in water*. Spon, London: 41-110.
- Sivonen K. (1996). Cyanobacterial toxins and toxin production. *Phycologia*, 35: 12-24
- Σολοβού Β. (2004). Επίδραση των τοξικών κυανοβακτηρίων στη λίμνη της Καστοριάς. Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης, Σχολή Θετικών Επιστημών, Τμήμα Βιολογίας. Διδακτορική διατριβή.
- Stackendrandt E., and Goebel B.M. (1994). Taxonomic note: a place for DNA-DNA reassociation an 16s rRNA sequence analysis in the present species definition in bacteriology. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44:846-849.
- Straub K.L., Hanzlik M., and Buchholz-Cleven B.E. (1998). The use of biologically produced ferrihydrite for the isolation of novel iron-reducing bacteria. *Systematic and Applied Microbiology*, 21: 442-449.
- Tabita F.R. (1987). Carbon dioxide fixation and its regulation in cyanobacteria. In: Fay P, Van Baalen C (eds) *The Cyanobacteria*. Elsevier, Amsterdam, p 95-117.
- Tarlera S. and Denner E.B.M. (2003). *Sterolibacterium denitrificans* gen. nov., sp. nov., a novel cholesterol-oxidizing, denitrifying member of the b-Proteobacteria. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 53:1085-1091.

- Temponeras M., Kristiansen J., and Moustaka-Gouni M. (2000). Seasonal variation in phytoplankton composition and physical-chemical features of the shallow Lake Doirani, Makedonia, Greece. *Hydrobiologia*, 424:109-122.
- Tiago I., Mendes V., Pires C., Morais P.V., and Verissimo A. (2005). *Phenylobacterium falsum* sp. nov., an Alphaproteobacterium isolated from a nonsaline alkaline groundwater, and emended description of the genus *Phenylobacterium*. *Systematic and Applied Microbiology*, 28:295-302.
- Tiago I., Chung A.P., and Verissimo A. (2004). Bacterial diversity in a nonsaline alkaline environment: heterotrophic aerobic populations. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:7378-7387.
- Tryfon E., and Moustaka-Gouni M. (1997). Species composition and seasonal cycles of phytoplankton with special reference to the nanoplankton of Lake Mikri Prespa. *Hydrobiologia*, 351:61-75.
- VanBaalen C. (1987). Nitrogen fixation. In Fay P, Van Baalen C (eds). *The Cyanobacteria*. Elsevier, Amsterdam, New York, Oxford: 187-197.
- Vardaka E. (2001). Toxic cyanobacteria and cyanobacterial toxins in lake Kastoria and in other freshwaters in Greece. Aristotle University of Thessaloniki. *Scientific Annals of the School of Biology of the Faculty of Sciences Appendix ISSN 1105-5049*: 1-8.
- Vardaka E., Moustaka-Gouni M., and Lanaras T. (2000). Temporal and spatial distribution of planktic cyanobacteria in Lake Kastoria, Greece, a shallow, urban lake. *Nordic Journal of Botany*, 20:501-511.

- Wintzingerode F., Selent B., Hegemann W., and Gobel U.B. (1999). Phylogenetic analysis of an anaerobic, trichlorobenzene-transforming microbial consortium. *Applied and Environmental Microbiology*, 65:283-286.
- Wu J.H., Liu W.T., Tseng I.C., and Cheng S.S. (2001). Characterization of microbial consortia in a terephthalate-degrading anaerobic granular sludge system. *Microbiology*, 147:373-382.
- Wu X., Xi W., Ye W., and Yang H. (2006). Bacterial community composition of a shallow hypertrophic freshwater lake in China, revealed by 16S rRNA gene sequences, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).
- Yeates C., and Blackall L.L. (2005). Construction and analysis of a metagenomic library from an enhanced biological phosphorus removal reactor, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).
- Zhang W., and Qian P. (2006). Microbial diversity and community structural shifts of sediments within the Victoria Harbour and its vicinity, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).
- Zhang H., Sekiguchi Y., Hanada S., Hugenholtz P., Kim H., Kamagata Y., and Nakamura K. (2001). *Gemmatimonas aurantiaca* gen. nov., sp. nov., a gram-negative, aerobic, polyphosphate-accumulating micro-organism, the first cultured representative of the new bacterial phylum Gemmatimonadetes phyl. nov. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53:1155-1163.
- Zhilina T.N., Zavarzin G.A., Rainey F., Kevbrin V.V., Kostrikina N.A., and Lysenko A.M. (1996). *Spirochaeta alkalica* sp. nov., *Spirochaeta africana* sp. nov., and *Spirochaeta asiatica* sp. nov., alkaliphilic anaerobes from the Continental Soda

Lakes in Central Asia and the East African Rift, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).

Zimmermann J., Meisinger D., Ludwig W., Schleifer K.H., Wanner G., Schmid M., Hartmann A., Bennet P.C., Summers-Engel A., and Lee N. (2006). In situ detection of novel Acidobacteria in microbial mats in a chemoautotrophic cave (Lower Kane Cave, WY, USA) by means of an extensive 16S rRNA and 23S rRNA multiple probe concept, ([www.ncbi.nlm.nih.gov/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/), πρόσβαση 25 Μαΐου 2006).

## ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

[http://bioinformatics.pcbasc.latrobe.edu.au/cgi-bin/ssrs.cgi?tax\\_id=221280](http://bioinformatics.pcbasc.latrobe.edu.au/cgi-bin/ssrs.cgi?tax_id=221280)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus>

<http://kpe-kastor.kas.sch.gr/limnology/limnology/references.htm>

<http://www.jochemnet.de/fiu/lab7.pdf#search=%22Spirochaeta%20genus%20characteristics%22>

<http://www.life.umd.edu/labs/delwiche/PSlife/lectures/Proteo.html>

[http://www.nioo.knaw.nl/SCIENCE/progress\\_report\\_2001-2002/pdf/progress\\_report\\_01-02\\_cl\\_me.pdf](http://www.nioo.knaw.nl/SCIENCE/progress_report_2001-2002/pdf/progress_report_01-02_cl_me.pdf).

[http://www.who.int/water\\_sanitation\\_health/bathing/srwe1-chap8.pdf](http://www.who.int/water_sanitation_health/bathing/srwe1-chap8.pdf)

<http://en.wikipedia.org/wiki/Bacillus> - Turnbull P.C.B. (1996). *Bacillus*. In: Barron's Medical Microbiology (Barron S et al, eds.), 4th ed., Univ of Texas Medical Branch

[www.ert.gr/aerialphoto/limnes-kastoria.asp](http://www.ert.gr/aerialphoto/limnes-kastoria.asp)

[www.gsrt.gr/default.asp?V\\_ITEM\\_ID=1632](http://www.gsrt.gr/default.asp?V_ITEM_ID=1632)

## 6. ABSTRACT

In this paper, the molecular diversity of bacteria in the sediment of the Cyanobacteria-rich Lake of Kastoria, was studied. Sediment was collected from three stations. DNA was isolated from the sediment, followed by cycle-optimised PCR amplification of the 16s rRNA genes with specific bacterial primers. A clone library with was constructed after cloning the purified PCR products. Genes were sequenced using capillary electrophoresis and the relative phylotypes were compared with ones of the database of Genbank with the use of BLAST. The existence of chimeric sequences was checked with the program CHIMERA\_CHECK of the Ribosomal Database Project, and these sequences were rejected. The construction of the phylogenetic tree of the 16s rRNA genes was made with software PAUP 4.0. Most of the phylotypes were relatives with uncultured representatives of Proteobacteria and mostly of  $\beta$ -Proteobacteria. Also there were representatives of the phyla Acidobacteria, Chlorobi, Chloroflexi, Firmicutes (Bacillales), Spirochaetes, Gemmatimonadetes, and Verrucomicrobia. Finally, no cyanobacterial sequences were identified, although the Lake of Kastoria is one of the lakes in Greece with toxic blooms of Cyanobacteria.

Keywords: sediment, lake, Bacteria, Kastoria, Greece



